

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-269652

(43)Date of publication of application : 25.09.1992

(51)Int.Cl.

G01N 27/447

(21)Application number : 03-031011

(71)Applicant : FUJI PHOTO FILM CO LTD

(22)Date of filing : 26.02.1991

(72)Inventor : SUGAWARA SHINICHI
OGINO HIKARI
YAMADA RYOSUKE

(54) CELLULOSE ACETATE SUPPORTER FOR ELECTRIC MIGRATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable wide application for various blood serums by adding a specific fat derivative in a micro porous film mainly composed of cellulose acetate.

CONSTITUTION: A micro porous film is made of mixture mainly composed of polymeric cellulose acetate for dividing blood serum protein by the use of a phase separation method. At this time an electric migration supporter of β lipo protein control disturbing judgement of inspection result in 5 fractionation rule is obtained by adding at least a kind of fat derivative expressed by following 3 general formulas to the film the general formulas are shown as follows: formula 1 is R_1COOM_1 ; formula 2 $R_2COOM_2OOCR_3$; formula 3 $R_4COOM_3(OOCR_5) OOCR_6$, where R_1 - R_6 represent an alkyl group of 11-3C and M_1 - M_3 represent metal atoms of monovalence to trivalence. In concrete terms, M_1 includes Li, Na, K, T, Ag and the like, M_2 includes Be, Mg, Ca, Sr, Ba, Cu, Pb, Ni, Zn and the like and M_3 includes Al and the like.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-269652

(43) 公開日 平成4年(1992)9月25日

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/447		7235-2 J	G 0 1 N 27/26	3 1 1 E

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全 4 頁)

(21) 出願番号	特願平3-31011	(71) 出願人	000005201 富士写真フイルム株式会社 神奈川県南足柄市中沼210番地
(22) 出願日	平成3年(1991)2月26日	(72) 発明者	菅原 伸一 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真 フイルム株式会社内
		(72) 発明者	荻野 光 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真 フイルム株式会社内
		(72) 発明者	山田 亮介 神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真 フイルム株式会社内

(54) 【発明の名称】 電気泳動用セルロースアセテート支持体

(57) 【要約】

【目的】 血清蛋白を分画することに用いられる電気泳動用支持体の分画性を改良する。

【構成】 $R_1 \text{ COOM}_1$ 、 $R_2 \text{ COOM}_2 \text{ COOCR}_3$ または $R_4 \text{ COOM}_3 (\text{OOCR}_5) \text{ OOCR}_5$ (ここで、 $R_1 \sim R_6$ はアルキル基、 $M_1 \sim M_3$ は金属原子を表わす。) で表わされる脂肪酸誘導体を含有する微多孔性膜である電気泳動用セルロースアセテート支持体。

【効果】 β -グロブリンの分画が明瞭になる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 セルロースアセテートを主成分とする微多孔性膜であり、その膜中に下記一般式(1)、(2)または(3)で表わされる脂肪酸誘導体を少なくとも1種含有することを特徴とする電気泳動用セルロースアセテート支持体。

一般式(1)



一般式(2)



一般式(3)



式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 は各々炭素数11個乃至30個のアルキル基、 M_1 、 M_2 、 M_3 は各々1価、2価、3価の金属原子を表わす。

【請求項2】 電気浸透係数がマイナス4.5mm乃至マイナス25mmの範囲にあることを特徴とする請求項1記載の電気泳動用セルロースアセテート支持体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、セルロースアセテートを主成分とした微多孔性膜である電気泳動用支持体に関するものであり、特に血清蛋白の分画用として好適な支持体に関するものである。

【0002】

【従来の技術】電気泳動法は電荷物質の分離、精製に用いられており、特に蛋白質の分離、分画に有用な方法である。電気泳動法には一般の電気泳動法の他に不連続緩衝液系を用い、分離を行なうディスク(Disc)電気泳動法、免疫拡散反応によって分離、検出を行なう免疫電気泳動法、pH勾配を電極間に形成させ、そのpH勾配の中で分離、分画を行なう等電点分画法等の方法がある。

【0003】この内、特に血清蛋白の分画は臨床検査の分野で行なわれており、この目的のために、セルロースアセテートなどの高分子を主成分とした微多孔性膜からなる電気泳動用支持体が多数用いられている。

【0004】高分子微多孔性膜支持体として、セルロースアセテート微多孔性膜を用いて電気泳動により血清蛋白を分画する方法として、濃度0.03~0.08モル/l、pH8.6の緩衝液に微多孔性膜を浸漬した後、血清を微多孔性膜表面に塗布し直流電流をかけて蛋白質を電気泳動させて分画後、蛋白質を染色する。染色用染料としてはボンソー3R、ボンソーS、ニグロシン、アミドブラック、クマシーブリリアントブルーなどの染料が用いられる。このようにして得られた分画染料像は通常5つの分画に分かれており陽極側から順にアルブミン分画、 α_1 -グロブリン分画、 α_2 -グロブリン分画、 β -グロブリン分画、 γ -グロブリン分画と命名されている。

【0005】血清蛋白は、上記のような電気泳動分析の

上では大きく5つの分画に分けられるが、5つの分画の各々が、同一の化学構成に属するものではなく、たまたま電気による易動度という点で、5つに分かれたのみであって、化学構造的には全く異なる種別に属するものが1つの分画に共存するに過ぎない。例えば、 β -グロブリン分画には、グロブリン成分のほか、LDLコレステロールと蛋白の複合体が共存する。また、 α_2 -グロブリン分画には、グロブリン成分のほかに、VLDLコレステロールと蛋白の複合体が含まれる。

10 【0006】前記のように、血清蛋白は血清中の蛋白質を、化学構造的に、単純明確に5系統に分類するものではないが、臨床検査の一次スクリーニングとして、先ず5つの分画に分け、それぞれの分画値が正常値と大きく異なった値になっていないか、確認するために行なわれるものである。一次スクリーニングとして先ず上記の5分画の検査を行なった上で、問題のある結果が得られたなら、更に精密な蛋白検査が実施されるのが常である。

【0007】近年、自動分析器が発達し、検査結果をコンピュータからのデジタルあるいはアナログアウトプットして読み取る方法が普及している。自動読み取り法は病態を更に正確に読み取れるという利点がある反面、通常血清蛋白を5分画に分類している中で、わずかな変動により余分なピークが発生したりすると、自動処理によるパターン認識の面で混乱が生じ、誤った読み取りをすることがある。従って、多少の変動が生じても一次スクリーニングを目的とした血清分画では、殆ど全ての血清に関して、5分画になるような分画性を持った電気泳動用支持体の開発が望まれている。

【0008】前述のVLDLコレステロールやLDLコレステロールと蛋白質との複合体の場合(これらは各々プレ β リポ蛋白、 β リポ蛋白と呼ばれる)、含有量の多少により、分画される位置が異なってくる。特に β リポ蛋白の場合、含有率が少ないと α_2 -グロブリン分画に含まれるが、含有量が増大すると α_2 -グロブリン分画と β -グロブリン分画との間に分画され、第6番目の分画となって、5分画を原則とした、検査結果を判断するのに障害になることがある。

【0009】この障害は、例えば特開昭63-262549号公報に記載の孔径分布範囲0.1 μ m乃至2.0 μ mの微多孔性膜からなる電気泳動用支持体、特開昭63-262550号公報に記載の特定の湿潤剤または可塑剤を高分子の重量に対して20%以下の割合で添加した微多孔性膜からなる電気泳動用支持体によって改善されたが、血清塗布量の多い場合はまだ不十分であった。このため、このような欠点のない支持体の開発が強く望まれていた。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は諸種の血清に広く適用できる電気泳動用支持体を提供することであり、特に β リポ蛋白を含む血清についても、 β リポ

3

蛋白による6番目の分画を生じないβリポ蛋白を制御した電気泳動用支持体を提供しようとするものである。

【0011】

【課題を解決するための手段】この点を改良するため、鋭意検討を重ねた結果、セルロースアセテートを主成分とする微多孔性膜において、その膜中に一般式(1)または(2)または(3)で表わされる脂肪酸誘導体を少なくとも1種含有させることによりβリポ蛋白を制御したセルロースアセテートを主成分とする電気泳動用支持体が得られることを見出した。

一般式(1)

$R_1 \text{ COOM}_1$

一般式(2)

$R_2 \text{ COOM}_2 \text{ OOCR}_3$

一般式(3)

$R_4 \text{ COOM}_3 \text{ (OOCR}_5\text{)OOCR}_6$

式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 は各々炭素数11個乃至30個のアルキル基、 M_1 、 M_2 、 M_3 は各々1価、2価、3価の金属原子を表わす。

【0012】具体的には M_1 としてLi、Na、K、Tl、Ag等 M_2 としてBe、Mg、Ca、Sr、Ba、Cu、Pb、Ni、Zn等 M_3 としてAl等が挙げられる。本発明の一般式(1)、(2)または(3)で表わされる化合物として具体的には次のものが挙げられる。

【0013】・ドデカン酸リチウム

・エイコサン酸カリウム

・トリアコンタン酸ナトリウム

・テトラデカン酸バリウム

・ヘキサデカン酸コバルト

・オクタデカン酸アルミニウム

【0014】本発明の微多孔性膜は実質的に乾燥した皮膜であり、厚さ約50μm乃至300μm、好ましくは110μm乃至170μmの範囲である。微孔の孔径範囲は約0.1μm乃至10.0μm、好ましくは0.1μm乃至5.0μmの範囲である。微孔のしめる空隙率は約50%乃至90%、好ましくは60%乃至85%である。電気泳動用支持体の電気浸透係数は特公昭55-31418の明細書に記載の方法により測定され、電気浸透係数はマイナス4.5mm乃至マイナス25mmの範囲が好ましい。

【0015】本発明の微多孔性膜からなる電気泳動用支持体は、特公昭55-31418号、特開昭50-12256号、特開昭55-76360号、特開昭63-262549号、特開昭63-262550号等の公報に記載の公知の方法に従って製造することができる。

【0016】本発明における主原料のセルロースアセテートは、ジアセチルセルロースとトリアセチルセルロースとの混合物が適し、その混合比はジアセチルセルロース：トリアセチルセルロース=3：7乃至6：4の範囲に設定することが可能であり、更に好ましくは両者の等

4

量混合物である。微多孔性膜を製膜するにはこれらセルロースアセテートの混合物を、親溶剤、貧溶剤、非溶剤の混合溶剤に溶解して作った均一なドープをガラス板または金属製のバンド上に流延、蒸発・乾燥させる微多孔性膜の製膜方法の一種である相分離法によって行なわれる。前記ドープ中には必要により非イオン性界面活性剤を含有させることができる。

【0017】ここで、親溶媒とはセルロースアセテートを溶解するものをいい、例えば、アセトン、塩化メチレン、酢酸エチル等がある。貧溶媒とは親溶剤とは相溶性があるが、実質的にセルロースアセテートを溶解せず、膨潤させるのみで、しかも親溶剤よりも沸点が高いものをいい、例えば、メタノール、エタノール、テトラヒドロフラン等である。非溶媒とは親溶剤または貧溶剤と相溶性があるが、セルロースアセテートを溶解も膨潤もしないもので、かつ親溶剤より沸点の高いものをいい、多くの場合水が用いられる。ここで良溶剤と貧溶剤との比は5：5乃至8：2の範囲に設定することが可能であり、好ましくは6：4乃至7：3である。非溶剤はドープに対して1～8wt%、好ましくは4～6wt%加えられる。この混合溶剤に対して1～30%、好ましくは5～10%の濃度にセルロースアセテートが溶解される。

【0018】溶媒の使用法、特に親溶剤、貧溶剤の使用法に関しては特公昭55-31418号、特開昭50-12256号、特開昭51-76360号等の公報に記載の手法を応用できる。

【0019】本発明の電気泳動用支持体に用いられる微多孔性膜の孔径分布範囲は、E. W. Wash Bahn 著「Proc. Natl. Acad. Sci.」No. 1, 1115 (1921年刊)、慶伊富長著 共立全書157「吸着」(130頁)、近藤連一著「多孔材料」(技報堂、1973年刊)、「化学工学」31巻60～66頁(1967年刊)等に記載の水銀厚入法で測定された値である。ここで、孔径分布とは水銀厚入法により得られた孔径-累積率表により、累積率が3%から97%の範囲に相当する孔径範囲を意味する。上述した製造法は本発明の電気泳動用支持体を得るための一例である。

【0020】βリポ蛋白を制御するための方法としては、一般式(1)または(2)または(3)で表わされる脂肪酸誘導体を加えることが効果的である。添加方法としては、ドープ中に加えるかまたは製膜した膜への2次的処理がある。この場合、セルロースアセテートに対する添加量によってβリポ蛋白に対する効果が異なるのでこれらの目的を達成するための好ましい一般式(1)または(2)または(3)で表わされる脂肪酸誘導体の添加量は主成分のセルロースアセテートに対して10ppm乃至5000ppmの範囲で含有させることが好ましい。添加量が少いと、本発明の効果が得られず、βリポ蛋白が6つ目の分画を形成してしまう。添加量が多すぎると、セルロースアセテート中に凝集することがある。

また、泳動された分画像が不鮮明になることがある。

【0021】

【実施例】下記組成で更に表1に示すような種類と量の化合物を加えて均一なドーブを調節した。このドーブを*

(ドーブ組成)

ジアセチルセルロース	3部
トリアセチルセルロース	3部
グリセロール	30部
トリアセチン	3部
メチレンクロライド	65部
メタノール	35部
水	4部

【0022】得られた微多孔性膜の厚さは約145 μ mであった。また、孔径をポアサイズ9310型(島津製作所(株)製)により測定したところ、約1.9 μ mであった。電気浸透係数を特公昭55-31418号公報に記載された方法に準じて測定したところ約マイナス19.4mmであった。

【0023】次に微多孔性膜を、26cm \times 7cmの大きさに切断し、オリンパス社製の自動電気泳動装置AES600で、試料の血清は健常人の新鮮血清蛋白で塗布量1.8 μ l(通常血清塗布量0.4~0.6 μ l)、緩衝液はペロナール、ペロナールナトリウム緩衝液(pH=8.6、0.06mol/リットル)、染色液は6%ト

*ガラス板上に厚さ1mmで流延し、温度25 $^{\circ}$ C、湿度65%雰囲気中で20分間放置した後、ガラス板から生成した膜を剥し、更に上記雰囲気中で20分間放置後、80 $^{\circ}$ Cのオープン乾燥機中で20分間乾燥を行なった。

リクロロ酢酸水溶液に溶かした0.6%ボンソー3R(和光純薬)溶液、脱色液は2%酢酸水溶液を用いて行なった。

【0024】血清蛋白の泳動パターンを観察したところ、表1に示すように実施例1~3の微多孔性膜において蛋白分画の数は5つで、 β リボ蛋白による6番目の分画は出現していなかった。これに対して、比較例1~3は β リボ蛋白による6番目の分画が出現した。なお、異常分画発生率は、サンプル数64個に対するものである。

【0025】

【表1】

表1

	添加した化合物		異常分画発生率 (%)
	種類	添加量(ppm)	
実施例1	ヘキサコン酸ナトリウム	50	0
実施例2	ステアリン酸カルシウム	25	0
実施例3	パルミチン酸アルミニウム	50	0
比較例1	—	—	58
比較例2	酢酸マグネシウム	200	43
比較例3	ステアリン酸	100	31